

# OPHTHALMIC MEDICINE COMPOSITION

## Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain an ophthalmic medicine composition containing a tetrapeptide at the C-terminal side of substance P as an active ingredient, promoting the cure of a wound in ectocornea, and capable of being used as a treating agent for a corneal disturbance.

SOLUTION: This ophthalmic medicine composition contains Phe-Gly-Leu-Met- NH<sub>2</sub> (hereinafter as FGLM) or a pharmaceutically permissible salt thereof as an active ingredient. Also, it is preferable to further contain an insulin like growth factor (hereinafter as IGF-I) as an active ingredient in the medicine. Thus, by coexisting FGLM with IGF-I, it becomes possible to promote the extension of ectocornea in a tissue culture system and the cure in the wound after an ablation of the ectocornea, and it becomes clear that the composition is useful for treating keratohelcosis, the ablation of the ectocornea, keratitis, a dry eye, etc.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-17489

(43) 公開日 平成10年(1998) 1月20日

| (51) Int.Cl. <sup>6</sup> | 識別記号 | 庁内整理番号 | F I           | 技術表示箇所 |
|---------------------------|------|--------|---------------|--------|
| A 6 1 K 38/00             | ABL  |        | A 6 1 K 37/02 | ABL    |
| 9/08                      |      |        | 9/08          | V      |
| 38/27                     |      |        | 37/36         |        |

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 7 頁)

|           |                     |          |  |
|-----------|---------------------|----------|--|
| (21) 出願番号 | 特願平8-165612         | (71) 出願人 | 596092779<br>西田 輝夫<br>山口県宇部市上野中町 1-34-304          |
| (22) 出願日  | 平成 8 年(1996) 6 月26日 | (71) 出願人 | 000177634<br>参天製薬株式会社<br>大阪府大阪市東淀川区下新庄 3 丁目 9 番19号 |
|           |                     | (72) 発明者 | 西田 輝夫<br>山口県宇部市上野中町 1-34-304                       |
|           |                     | (72) 発明者 | 中村 雅胤<br>奈良県奈良市三松 2 丁目12番 3-205号                   |
|           |                     | (72) 発明者 | 中田 勝彦<br>奈良県桜井市大字箸中531番地の 1                        |
|           |                     | (74) 代理人 | 弁理士 岸本 瑛之助 (外 3 名)                                 |

(54) 【発明の名称】 眼科用医薬組成物

(57) 【要約】

【課題】 サブスタンス P の最小活性発現部位を見つけ出し、その最小単位の化合物の眼科領域についての作用を解明し、これを有効成分とする眼科用医薬組成物を提供する。

【解決手段】 本発明は P h e - G l y - L e u - M e t - N H <sub>2</sub>、またはその医薬として許容される塩類を有効成分とする眼科用医薬組成物、特に角膜障害治療剤である。また、本発明は P h e - G l y - L e u - M e t - N H <sub>2</sub>、またはその医薬として許容される塩類、およびインシュリン様成長因子 - I を有効成分とする角膜障害治療剤、特に角膜上皮伸展促進剤である。好ましい剤型は点眼剤である。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】  $\text{Phe-Gly-Leu-Met-NH}_2$ 、またはその医薬として許容される塩類を有効成分とする眼科用医薬組成物。

【請求項2】  $\text{Phe-Gly-Leu-Met-NH}_2$ 、またはその医薬として許容される塩類を有効成分とする角膜障害治療剤。

【請求項3】  $\text{Phe-Gly-Leu-Met-NH}_2$ 、またはその医薬として許容される塩類、およびインシュリン様成長因子-Iを有効成分とする角膜障害治療剤。

【請求項4】 角膜障害が角膜潰瘍、角膜上皮剥離、角膜炎またはドライアイである請求項2または請求項3記載の角膜障害治療剤。

【請求項5】 角膜障害が角膜上皮剥離またはドライアイである請求項2または請求項3記載の角膜障害治療剤。

【請求項6】 剤型が点眼剤である請求項2から請求項5のいずれかに記載の角膜障害治療剤。

【請求項7】  $\text{Phe-Gly-Leu-Met-NH}_2$ 、またはその医薬として許容される塩類、およびインシュリン様成長因子-Iを有効成分とする角膜上皮伸展促進剤。

【請求項8】 剤型が点眼剤である請求項7記載の角膜上皮伸展促進剤。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明はサブスタンスPのC末端側のテトラペプチドである $\text{Phe-Gly-Leu-Met-NH}_2$ （以下、FGLMとする）またはその医薬として許容される塩類を有効成分とする眼科用医薬組成物に関するものである。特に、成長因子の1つであるインシュリン様成長因子-I（以下、IGF-Iとする）をもう一つの有効成分とし、それらの成分を配合または併用することを特徴とした、角膜上皮の創傷治癒促進作用を有する角膜障害治療剤に関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】角膜は直径約1cm、厚さ約1mmの透明な無血管の組織である。角膜の透明性は視機能に重要な影響を与えており、角膜における種々の生理生化学的現象は、主として角膜の透明性の維持ということを目

として機能している。  
【0003】角膜潰瘍、角膜上皮剥離、角膜炎またはドライアイ等の種々の疾患により引き起こされた角膜上皮欠損は、混合感染の併発がなければ自然に修復する。しかし、何らかの理由で修復が遅延したりあるいは修復が行われずに上皮欠損が遷延化すると、上皮の正常な構築に悪影響を与えるのみならず、実質や内皮の構造や機能まで害される。従来からの治療法の原理は、外界の刺激から角膜表面を保護することにより自然に上皮が伸展し

て欠損部の再被覆をはかるという受動的なものである。近年、細胞生物学の発展に伴い、細胞の分裂・移動・接着・伸展等に関与する因子が解明されており、角膜上皮欠損の修復には、角膜上皮の伸展を促進する化合物が重要な役割を担うことが報告されている（臨眼、46、738-743（1992）、眼科手術、5、719-727（1992））。

【0004】ところで、FGLMはアメリカ特許3862114号公報に開示されているサブスタンスPのC末端側のテトラペプチドであり、降圧作用を有することが該公報に記載されている。サブスタンスPは血管拡張、平滑筋収縮、唾液腺の分泌促進、利尿作用等を示す11個のアミノ酸からなるポリペプチドである。サブスタンスPについては眼科領域においても、眼障害における結膜杯細胞の異常分泌の改善が開示されていたり（国際特許WO95/13087号公開公報）、角膜炎等の炎症時におけるサブスタンスPの動態が報告されている（日本眼科学会雑誌、91、982-987（1987）、日本眼科学会雑誌、92、448-452（1988）等、さまざまな研究がなされているが、その部分ペプチドであるFGLMについての眼科領域に関する報告はない。

【0005】一方、インシュリン様成長因子は、表皮成長因子、繊維芽細胞成長因子、血小板由来成長因子、形質転換成長因子等のように、正常ヒト細胞の成長を調節している成長因子の1つで、IGF-Iとインシュリン様成長因子-II（以下、IGF-IIとする）がある。最近、IGF-Iが甲状腺細胞の増殖を刺激すること（J. Biol. Chem., 264, 18485-18488（1989））や、IGF-IIが筋の成長や分化を調節すること（Hum. Mol. Gene., 3, 1117-1121（1994））等も報告されている。眼科領域においても、IGF-I、IGF-IIおよびそれらの機能的誘導体が網膜ニューロンの生存を促進させること（特表平7-500839号公報）、IGF-IIが角膜移植時の損傷を始めとする広範囲のあらゆる傷の治療に有効であること（特開昭63-233925号公報）、上記の成長因子を含む溶液を用いることによって移植に供される角膜等の眼組織を低温状態で新鮮な組織状態で保存することが可能であること（特開平5-25001号公報、特開平6-48901号公報）が開示されている。さらに、一般的に成長因子を含むゲル配合物が前眼部を始めとする創傷の治癒に有効であることも開示されている（特開平2-112号公報）。しかしながら、該公報で具体的に開示されている成長因子は表皮成長因子だけであり、IGF-Iの効果については記載されていない。ところで、IGF-IIは上述のように角膜移植時の損傷等の治療に有用であることは知られているが、IGF-Iについては角膜上皮の創傷治癒に影響を及ぼさないことが報告されているにすぎない（Connect. Tissue, 27, 65（1995））。

【0006】サブスタンスPは、それだけでは角膜上皮の創傷治癒に影響を及ぼさないが、成長因子のうち表皮

10

20

30

40

50

成長因子 (Prog. Med., 13, 2626-2627 (1993)) や IGF-I (Connect. Tissue, 27, 65 (1995)) と共存すると角膜上皮の創傷治癒を促進することが報告されている。しかしながら、サブスタンスPのどの部分が活性発現部位なのかは明らかにされていない。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】上記のように、サブスタンスPの最小活性発現部位を見つけ出し、その最小単位の化合物の眼科領域についての作用、特に角膜障害に対する作用についての研究は非常に興味ある課題であった。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者等はサブスタンスPのC末端側の部分ペプチドに着目し、角膜障害に対する作用を検討した。その結果、サブスタンスPのC末端側のテトラペプチドであるFGLMが、IGF-Iと共存することで角膜上皮の創傷治癒を促進し、かつ、FGLMがこの作用を発現するサブスタンスPの部分ペプチドの最小単位であることを見出した。すなわち、FGLMの眼科用医薬組成物としての新しい用途を見出すとともにFGLMまたはその医薬として許容される塩類に、もう一つの有効成分としてIGF-Iを用いると、種々の要因により角膜が損傷を受けた状態にある角膜潰瘍、角膜上皮剥離、角膜炎またはドライアイ等の角膜障害の治療剤として有用であることが見い出された。

【0009】

【発明の実施の形態】FGLMはサブスタンスPのC末端側のテトラペプチドで、Phe-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub>の構造を有するものである。Phe、LeuおよびMetについてはL-体、D-体、DL-体が存在するが、それらはすべて本発明に含まれる。より好ましい形態はすべてL-体の化合物である。

【0010】FGLMの医薬として許容される塩類としては、例えば塩酸塩、硫酸塩、リン酸塩、乳酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、シュウ酸塩、メタンスルホン酸塩、パラトルエンスルホン酸塩等が挙げられる。

【0011】本発明でいう角膜障害とは、種々の要因により角膜が損傷を受けた状態にある角膜潰瘍、角膜上皮剥離、角膜炎、ドライアイ等をいう。

【0012】FGLMおよびIGF-Iの有用性を調べるべく、角膜障害への影響を検討した。詳細については後述の薬理試験の項で示すが、FGLMとIGF-Iの共存によって、角膜片の組織培養系における角膜上皮の伸展ならびに角膜上皮剥離後の創傷治癒を促進することを認めた。このことから、FGLMおよびIGF-Iは、角膜障害、すなわち種々の要因により角膜が損傷を受けた状態にある角膜潰瘍、角膜上皮剥離、角膜炎、ドライアイ等、特に角膜上皮剥離およびドライアイの治療に有用であることが明らかとなった。

\*

処方例1 (点眼液)

\*【0013】FGLMまたはその医薬として許容される塩類、およびIGF-Iは、経口でも、非経口でも投与することができ、それらの有効成分を配合または別々に調剤したものを併用してもよい。投与剤型としては、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、注射剤、点眼剤等が挙げられ、特に点眼液、眼軟膏等の点眼剤が好ましい。これらは汎用されている技術を用いて製剤化することができる。例えば、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤等の経口剤であれば、乳糖、結晶セルロース、デンプン、植物油等の増量剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリビニルピロリドン等の結合剤、カルボキシメチルセルロース、カルシウム、低置換ヒドロキシプロピルメチルセルロース等の崩壊剤、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、マクロゴール、シリコン樹脂等のコーティング剤、ゼラチン皮膜等の皮膜剤などを必要に応じて加えればよい。また、点眼液であれば、塩化ナトリウム等の等張化剤、リン酸ナトリウム等の緩衝化剤、塩化ベンザルコニウム等の防腐剤等を用いて製剤化することができる。pHは眼科製剤に許容される範囲内であればよいが、4~8の範囲が好ましい。眼軟膏であれば、白色ワセリン、流動パラフィン等の汎用される基剤を用いて調剤することができる。

【0014】投与量は症状、年齢、剤型等によって適宜選択できる。経口剤であればFGLMまたはその医薬として許容される塩類、およびIGF-Iの投与量は通常1日当たりそれぞれ0.1~5000mg (FGLMとして) および0.001~100mg、好ましくはそれぞれ1~1000mg (FGLMとして) および0.01~10mgであり、投与は1回でまたは数回に分けて行なうことができる。また、点眼剤であればそれぞれの有効成分の濃度は0.001~10% (w/v) (FGLMとして) および0.00001~0.1% (w/v)、好ましくは0.01~1% (w/v) (FGLMとして) および0.0001~0.01% (w/v) であり、投与は1日1~数回点眼する形で行なうことができる。

【0015】以下に、製剤例および薬理試験の結果を示すが、これらの例は本発明をよりよく理解するためのものであり、本発明の範囲を限定するものではない。

【0016】

【実施例】

【製剤例】本発明に用いられる代表的な製剤例を以下に示す。

【0017】1. 点眼剤

以下の処方点眼剤を汎用される方法を用いて調剤した。

【0018】

5

6

100ml中

FGLM

100mg

塩化ナトリウム

900mg

水酸化ナトリウム

適量

塩酸

適量

滅菌精製水

適量

処方例1と同様にして、FGLMを100ml中1mg、5mg、10mg、50mg、500mg、1000mg含有する点眼液を調製することができる。  
【0019】

処方例2 (点眼液)

100ml中

IGF-I

1mg

塩化ナトリウム

900mg

水酸化ナトリウム

適量

塩酸

適量

滅菌精製水

適量

処方例2と同様にして、IGF-Iを100ml中0.01mg、0.05mg、0.1mg、0.5mg、5mg、10mg、50mg、100mg含有する点眼液※を調製することができる。  
【0020】

処方例3 (点眼液)

100ml中

FGLM

100mg

IGF-I

1mg

塩化ナトリウム

900mg

水酸化ナトリウム

適量

塩酸

適量

滅菌精製水

適量

処方例3と同様にして、FGLM、1mg、5mg、10mg、50mg、500mg、1000mg及びIGF-I、0.01mg、0.05mg、0.1、0.5★mg、10mg、50mg、100mgを任意の組み合わせで配合した点眼液を調製することができる。  
【0021】

処方例4 (眼軟膏)

100g中

FGLM

100mg

IGF-I

1mg

白色ワセリン

90g

流動パラフィン

適量

処方例4と同様にして、FGLM、1mg、5mg、10mg、50mg、100mg、500mg、1000mg及びIGF-I、0.01mg、0.05mg、0.1mg、0.5mg、1mg、10mg、50mg、100mgを任意の組み合わせで配合した眼軟膏を☆40調製することができる。  
【0022】 2. 錠剤  
以下の処方の錠剤を汎用される方法を用いて調製した。  
【0023】

処方例5

100mg中

FGLM

10mg

乳糖

59.4mg

トウモロコシデンプン

20mg

カルボキシメチルセルロース カルシウム

6mg

ヒドロキシプロピルセルロース

4mg

ステアリン酸 マグネシウム

0.6mg

上記処方の錠剤に、ヒドロキシプロピルセルロース等のコーティング剤2mgを用いてコーティングすることができる。

【0024】 処方例5と同様にして、FGLMを100

mg中0.1mg、0.5mg、1mg、5mg、50 \*【0025】  
mg含有する錠剤を得ることができる。 \*

#### 処方例6

100mg中

IGF-I

0.1mg

乳糖

69.3mg

トウモロコシデンプン

20mg

カルボキシメチルセルロース カルシウム

6mg

ヒドロキシプロピルセルロース

4mg

ステアリン酸 マグネシウム

0.6mg

上記処方例の錠剤に、ヒドロキシプロピルセルロース等のコーティング剤2mgを用いてコーティングすることができる。

※0mg中0.001mg、0.01mg、0.05mg、0.5mg、1mg、5mg、10mg、50mg含有する錠剤を得ることができる。

【0026】処方例6と同様にして、IGF-Iを10※

【0027】

#### 処方例7

100mg中

FGLM

10mg

IGF-I

0.1mg

乳糖

59.3mg

トウモロコシデンプン

20mg

カルボキシメチルセルロース カルシウム

6mg

ヒドロキシプロピルセルロース

4mg

ステアリン酸 マグネシウム

0.6mg

上記処方例の錠剤に、ヒドロキシプロピルセルロース等のコーティング剤2mgを用いてコーティングすることができる。

★ンで包埋して切片を作製した。切片を脱パラフィンした後、ヘマトキシリン-エオジン染色し、顕微鏡下で上皮細胞層の伸展長を測定した。

【0028】処方例7と同様にして、FGLM、0.1mg、0.5mg、1mg、5mg、10mg及びIGF-I、0.001mg、0.01mg、0.05mg、0.1mg、0.5mg、1mg、5mg、10mgを任意の組み合わせで配合した錠剤を得ることができる。

【0031】コントロールとしては被験化合物を含まない培養液で同様に培養したものを用いた。

【0029】[薬理試験]

1) 角膜上皮伸展に対する作用 (in vitro)

雄性日本白色ウサギの角膜を用い、Nishida らの方法 (J. Cell Biol., 97,1653-1657 (1983)) に準じ、角膜片の組織培養系での角膜上皮伸展長を指標にして角膜上皮伸展に対する影響を検討した。

【0030】(実験方法) ウサギ角膜片より切り出した角膜ブロック(1群6個)を、被験化合物を含む培養液(40 TC-199)中、37℃・5%CO<sub>2</sub>の条件下で24時間培養した。培養後、角膜ブロックをエタノール-氷酢酸(容積比95:5)混合液中で固定し、パラフィ★

【0032】(結果) 実験結果の一例として、FGLM単独、IGF-I単独、FGLMとIGF-Iの両方を含む培養液で培養したときの結果を表1に示す。また、IGF-Iとともに培養液に添加するペプチドをGly-Leu-Met-NH<sub>2</sub> (以下、GLMとする)、FGLM、Val-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub> (以下、VGLMとする)、Ile-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub> (以下、IGLMとする)、Tyr-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub> (以下、YGLMとする)、Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub> (以下、FFGLMとする)としたときの結果を表2に示す。

【0033】

【表1】

|                               | 伸展長 (μm) |
|-------------------------------|----------|
| コントロール                        | 433      |
| FGLM (20μM)                   | 426      |
| IGF-I (10ng/ml)               | 430      |
| FGLM (20μM) + IGF-I (10ng/ml) | 662      |

【0034】

\* \* 【表2】

|                 | 伸展長 (μm) |
|-----------------|----------|
| コントロール          | 433      |
| IGF-I (10ng/ml) | 430      |
| +GLM (20μM)     | 445      |
| +FGLM (20μM)    | 662      |
| +VGLM (20μM)    | 440      |
| +IGLM (20μM)    | 426      |
| +YGLM (20μM)    | 433      |
| +FFGLM (20μM)   | 655      |

【0035】表1に示すように、FGLM単独またはIGF-I単独では角膜上皮の伸展に対する影響は認められなかったが、FGLMとIGF-Iを両方含む培養液で培養をすると、角膜上皮の伸展に対して顕著な促進が認められた。

【0036】また、表2に示すように、培養液にIGF-Iとともに添加するペプチドについては、FGLMまたはFFGLMを添加した場合は角膜上皮の伸展に対して顕著な促進が認められたが、サブスタンスPのC末端トリペプチドやFGLMの類似ペプチドを添加した場合は角膜上皮の伸展に対する影響は認められなかった。

【0037】2) 角膜創傷治癒促進作用 (in vivo) 雄性日本白色ウサギを用い、Cintron らの方法 (Ophthalmic Res., 11, 90-96 (1979)) に準じて角膜上皮剥離を起こさせ、フルオレセイン染色面積を指標として創傷面積を測定し、角膜創傷治癒に対する影響を検討した。

【0038】(実験方法) 角膜上皮剥離を起こさせた ※30 【表3】

※後、被験化合物を含む点眼液を2時間間隔で1日6回 (50μl/回) 点眼した。創傷面積を測定する際に、フルオレセイン染色を行い角膜の写真を測定した。撮影した角膜のフルオレセイン染色面積は、画像解析処理システムを用いて算出した。

【0039】コントロールとしては被験化合物を含まない基剤を点眼したウサギを用いた。

【0040】(結果) 実験結果の一例として、0.05% (w/v) FGLM点眼液 (点眼液F-3) 単独、0.0001% (w/v) IGF-I点眼液 (点眼液I-6) 単独、0.05% (w/v) FGLM点眼液 (点眼液F-3) と0.0001% (w/v) IGF-I点眼液 (点眼液I-6) の両方を点眼したときの、上皮剥離直後、12、24、36、48時間後における創傷面積を表3に示す。

【0041】

|              | 上皮剥離後の創傷面積 (mm <sup>2</sup> ) |      |      |      |      |
|--------------|-------------------------------|------|------|------|------|
|              | 0時間                           | 12時間 | 24時間 | 36時間 | 48時間 |
| コントロール       | 35.4                          | 31.6 | 20.6 | 11.7 | 3.3  |
| FGLM         | 35.4                          | 31.0 | 19.9 | 10.9 | 2.9  |
| IGF-I        | 35.5                          | 30.3 | 19.0 | 10.0 | 2.6  |
| FGLM + IGF-I | 35.5                          | 28.1 | 10.5 | 2.4  | 0.1  |

【0042】表3に示すように、FGLM単独またはIGF-I単独では角膜上皮剥離後の創傷治癒に対する影響は認められなかったが、FGLMとIGF-Iの両方を点眼すると、創傷治癒に対して顕著な促進が認められた。

【0043】

【発明の効果】上記の薬理試験から、サブスタンスPの部分ペプチドの1つであるFGLMまたはその医薬として許容される塩類が成長因子の1つであるIGF-Iと共存することで、角膜上皮の創傷治癒促進作用を有し、

種々の要因により角膜が損傷を受けた状態にある角膜潰瘍、角膜上皮剥離、角膜炎またはドライアイ等の角膜障害の治療剤として有用であることが見出された。

【0044】また、サブスタンスPのC末端側のテトラペプチドやペンタペプチドではIGF-Iと共存して角膜上皮伸展促進作用を認められたが、サブスタンスPのC末端側のトリペプチドでは認められなかったことから、角膜上皮の創傷治癒促進作用を有するために必要なIGF-Iと共存するサブスタンスPの部分ペプチドの最小単位はC末端側のテトラペプチドであることが明ら

かとなった。さらに、そのテトラペプチドのN末端のアミノ酸がPhe以外では角膜上皮伸展促進作用が認められなかったことから、角膜上皮の創傷治癒促進作用を有

するために必要なIGF-Iと共存するテトラペプチドはサブスタンスPのC末端側のテトラペプチドであるFGLMでなければならないことが明らかとなった。



**\* NOTICES \***

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

**CLAIMS**

---

[Claim(s)]

[Claim 1] Phe-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub> Or drug-used-in-ophthalmology constituent which makes an active principle the salts permitted as the physic.

[Claim 2] Phe-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub> Or cornea failure therapy agent which makes an active principle the salts permitted as the physic.

[Claim 3] Phe-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub> Or the salts permitted as the physic and the cornea failure therapy agent which makes insulin-like growth factor-I an active principle.

[Claim 4] The cornea failure therapy agent according to claim 2 or 3 whose cornea failure is a corneal ulcer, epithelium-antérieur-corneae exfoliation, keratitis, or dry eye.

[Claim 5] The cornea failure therapy agent according to claim 2 or 3 whose cornea failure is epithelium-antérieur-corneae exfoliation or dry eye.

[Claim 6] A cornea failure therapy agent given in either of claim 2 to claims 5 whose pharmaceutical forms are ophthalmic solutions.

[Claim 7] Phe-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub> Or the salts permitted as the physic and the epithelium-antérieur-corneae expansion accelerator which makes insulin-like growth factor-I an active principle.

[Claim 8] The epithelium-antérieur-corneae expansion accelerator according to claim 7 whose pharmaceutical forms are ophthalmic solutions.

---

[Translation done.]

## \* NOTICES \*

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

## DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention] This invention relates to the drug-used-in-ophthalmology constituent which makes an active principle the salts permitted as Phe-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub> which is the tetrapeptide by the side of the C terminal of substance P, or (hereafter referred to as FGLM) its physic. Especially, insulin-like growth factor-I (it considers as IGF-I hereafter) which is one of the growth factors is made into another active principle, and it is related with the cornea failure therapy agent which was characterized by blending or using those components together and which has a wound healing promotion operation of the epithelium antierius corneae.

[0002]

[Description of the Prior Art] A cornea is the organization of a transparent non-blood vessel with a diameter [ of about 1cm ], and a thickness of about 1mm. The transparency of a cornea has had effect important for a visual function, and the various physiology biochemical phenomena in a cornea are functioning mainly for the purpose of saying [ maintenance of the transparency of a cornea ].

[0003] The epithelium-antierius-corneae deficit caused by various diseases, such as a corneal ulcer, epithelium-antierius-corneae exfoliation, keratitis, or dry eye, will be automatically restored, if there is no concurrence of mixed infection. However, if restoration is delayed by a certain reason or an epithelium deficit prolongment-izes, without performing restoration, it not only has a bad influence on normal construction of an epithelium, but it will be injured to the structure and the function of parenchyma or an inner bark. By protecting a cornea front face from a stimulus of the external world, an epithelium extends with nature and the principle of the cure from the former aims at [ passive ] recovering of the deficit section. In recent years, the factor which participates in fission, migration, adhesion, expansion, etc. of a cell is solved with development of cell biology, and it is reported to restoration of an epithelium-antierius-corneae deficit that the compound which promotes expansion of the epithelium antierius corneae bears an important role (\*\*\*\*, 46, 738-743 (1992), an ophthalmology operation, 5, 719-727 (1992)).

[0004] By the way, FGLM is the tetrapeptide by the side of the C terminal of the substance P currently indicated by U.S. JP,3862114,B, and having a pressure-lowering operation is indicated by this official report. Substance P is a polypeptide which consists of 11 amino acid in which the promotion of secretion of vasodilatation, smooth muscle contraction, and salivary glands, a diuretic effect, etc. are shown. Also in an ophthalmology field, about substance P, the improvement of abnormality secretion of the conjunctiva goblet cell in an ophthalmopathy is indicated, or (The international patent WO 95/No. 13087 public presentation official report), Although various researches (1988) -- the moving state of the substance P at the time of inflammation, such as keratitis, is reported (the Japanese Ophthalmological Society magazine, 91, 982-987 (1987), the Japanese Ophthalmological Society magazine, 92, and 448-452) -- are made There is no report of the ophthalmology field about FGLM which is the partial peptide.

[0005] On the other hand, like an epidermal growth factor, a fibroblast growth factor, a platelet derived growth factor, and a transformation growth factor, an insulin-like growth factor is one of the growth factors which is adjusting growth of a normal human cell, and is IGF-I and an insulin-like growth factor. - There is II (it considers as IGF-II hereafter). It is reported that IGF-I stimulates growth of a thyroid cell recently (J.Biol.Chem., 264, and 18485-18488 (1989)), that IGF-II adjusts growth and differentiation of a muscle (Hum.Mol.Genet., 3, and 1117-1121), etc. (1994). Also in an ophthalmology field, IGF-I, IGF-II, and those functional derivatives promote survival of retina neurone (Patent Publication Heisei No. 500839 [ seven to ] official report), IGF-II is effective in the therapy of all wide range blemishes including the damage at the time of a corneal transplantation (JP,63-233925,A), It is indicated by using the solution containing the above-mentioned growth factor that it is possible to save eye organizations, such as a cornea with which transplantation is presented, in the state of a fresh organization in the state of low temperature (JP,5-25001,A, JP,6-

48901,A). Furthermore, it is indicated that the gel compound which generally contains a growth factor is also effective in recovery of wounds including an anterior eye segment (JP,2-112,A). However, the growth factor currently concretely indicated in this official report is only an epidermal growth factor, and the effectiveness of IGF-I is not indicated. By the way, although it is known that IGF-II is useful for the therapy of the damage at the time of a corneal transplantation etc. as mentioned above, about IGF-I, not affecting the wound healing of the epithelium anterior corneae is reported (Connect.Tissue, 27, and 65 (1995)).

[0006] Promoting the wound healing of the epithelium anterior corneae, if it coexists with an epidermal growth factor (Prog.Med., 13, and 2626-2627 (1993)) or IGF-I (Connect.Tissue, 27, and 65 (1995)) among growth factors although substance P does not affect the wound healing of the epithelium anterior corneae only by it is reported. However, it is not shown clearly which part of substance P is an activity manifestation part.

[0007]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] As mentioned above, the minimum activity manifestation part of substance P was found out, and the research on the operation about the ophthalmology field of the compound of the smallest unit, especially the operation over a cornea failure was a very interesting technical problem.

[0008]

[Means for Solving the Problem] this invention person etc. considered the operation over a cornea failure paying attention to the partial peptide by the side of the C terminal of substance P. Consequently, it found out that it was the smallest unit of the partial peptide of substance P with which FGLM which is the tetrapeptide by the side of the C terminal of substance P promotes the wound healing of the epithelium anterior corneae by coexisting with IGF-I, and FGLM discovers this operation. That is, while finding out the new application as a drug-used-in-ophthalmology constituent of FGLM, when IGF-I was used for the salts permitted as FGLM or its physic as another active principle, it was found out that it is useful as a therapy agent of cornea failures, such as a corneal ulcer in the condition that the cornea received damage according to various factors, epithelium-anterius-corneae exfoliation, keratitis, or dry eye.

[0009]

[Embodiment of the Invention] FGLM is the tetrapeptide by the side of the C terminal of substance P, and is Phe-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub>. It has structure. Phe, Leu, and Met L - The body, D-object, DL - Although the body exists, they are all contained in this invention. More desirable gestalten are all. L - It is a bodily compound.

[0010] As salts permitted as physic of FGLM, a hydrochloride, a sulfate, phosphate, a lactate, a maleate, a fumaric-acid salt, an oxalate, a methansulfonic acid salt, a Para toluenesulfonic acid salt, etc. are mentioned, for example.

[0011] The cornea failure as used in the field of this invention means the corneal ulcer in the condition that the cornea received damage according to various factors, epithelium-anterius-corneae exfoliation, keratitis, dry eye, etc.

[0012] The effect on a cornea failure was considered in order to investigate the usefulness of FGLM and IGF-I.

Although the term of the below-mentioned pharmacological test showed for details, it admitted promoting the wound healing after expansion of the epithelium anterior corneae in the tissue culture system of the piece of a cornea, and epithelium-anterius-corneae exfoliation by coexistence of FGLM and IGF-I. FGLM and IGF-I became clear [ that it is especially useful for epithelium-anterius-corneae exfoliation and the therapy of dry eye, such as a corneal ulcer in a cornea failure, i.e., the condition that the cornea received damage according to various factors, epithelium-anterius-corneae exfoliation, keratitis, and dry eye, ] from this.

[0013] Even if taking orally is also parenteral, it can be prescribed for the patient, and the salts permitted as FGLM or its physic and IGF-I may use [ taking orally ] together combination or the thing prepared separately for those active principles. As an administration pharmaceutical form, a tablet, a capsule, a granule, powder, injections, ophthalmic solutions, etc. are mentioned, and ophthalmic solutions, such as eye lotions and an eye ointment, are especially desirable. These can be pharmaceutical-preparation-ized using the technique currently used widely. For example, if it is oral agents, such as a tablet, a capsule, a granule, and powder, they are binders, such as lubricant, such as extending agents, such as a lactose, crystalline cellulose, starch, and vegetable oil, magnesium stearate, and talc, hydroxypropylcellulose, and a polyvinyl pyrrolidone, and a carboxymethyl cellulose. What is necessary is just to add film forming agents, such as coating agents, such as disintegrator, such as calcium and low permutation hydroxypropyl methylcellulose, hydroxypropyl methylcellulose, macro gall, and silicon resin, and a gelatin coat, etc. if needed.

Moreover, if it is eye lotions, it can pharmaceutical-preparation-ize using antiseptics, such as buffer-ized agents, such as isotonizing agents, such as a sodium chloride, and sodium phosphate, and a benzalkonium chloride, etc. Although there should just be pH within limits permitted by ophthalmology pharmaceutical preparation, the range of 4-8 is desirable. If it is an eye ointment, it can prepare using bases used widely, such as white vaseline and a liquid paraffin.

[0014] A dose can be suitably chosen by the symptom, age, a pharmaceutical form, etc. the salts permitted as FGLM or its physic if it is an oral agent, and the dose of IGF-I -- usually -- per [ of 0.1-5000mg (as FGLM) of each ] day, and

0.001-100mg -- desirable -- respectively -- 1-1000mg (as FGLM), and 0.01-10mg -- it is -- administration -- 1 time -- or it can carry out in several steps. Moreover, if it is ophthalmic solutions, 0.00001 to 0.1% (w/v), it is 0.01 - 1% (w/v), and 0.0001 - 0.01% (w/v) preferably (as FGLM), and the concentration of each active principle can perform administration in 0.001 - 10% (w/v), and the form where eyewash is applied 1 to several times per day (as FGLM). [0015] Although the result of the example of pharmaceutical preparation and a pharmacological test is shown below, these examples are for understanding this invention better, and do not limit the range of this invention.

[0016]

[Example]

The typical example of pharmaceutical preparation used for [example of pharmaceutical preparation] this invention is shown below.

[0017] 1. It prepared using the approach of having the ophthalmic solutions of the formula below ophthalmic solutions used widely.

[0018]

The example 1 (eye lotions) of a formula

The inside of 100ml FGLM 100mg A sodium chloride 900mg A sodium hydroxide Optimum dose A hydrochloric acid Optimum dose Sterile purified water 1mg, 5mg, and 500mg of 50mg of 10mg of eye lotions contained 1000mg can be prepared for FGLM among 100ml like the example 1 of an optimum dose formula.

[0019]

The example 2 (eye lotions) of a formula

The inside of 100ml IGF-I 1mg A sodium chloride 900mg A sodium hydroxide Optimum dose A hydrochloric acid Optimum dose Sterile purified water 0.01mg, 0.05mg, 0.1mg, 0.5mg, and 50mg of 10mg of 5mg of eye lotions contained 100mg can be prepared for IGF-I among 100ml like the example 2 of an optimum dose formula.

[0020]

The example 3 (eye lotions) of a formula

The inside of 100ml FGLM 100mg IGF-I 1mg A sodium chloride 900mg A sodium hydroxide Optimum dose A hydrochloric acid Optimum dose Sterile purified water It is made to be the same as that of the example 3 of an optimum dose formula. FGLM, 1mg, The eye lotions which blended 5mg, 10mg, 50mg, 500mg, 1000mg and IGF-I, 0.01mg, 0.05mg, 0.1, 0.5mg, 10mg, 50mg, and 100mg in the combination of arbitration can be prepared.

[0021]

The example 4 (eye ointment) of a formula

The inside of 100g FGLM 100mg IGF-I 1mg White vaseline 90g A liquid paraffin It is made to be the same as that of the example 4 of an optimum dose formula. FGLM, 1mg, 5mg, 10mg, The eye ointment which blended 50mg, 100mg, 500mg, 1000mg and IGF-I, 0.01mg, 0.05mg, 0.1mg, 0.5mg, 1mg, 10mg, 50mg, and 100mg in the combination of arbitration can be prepared.

[0022] 2. It prepared using the approach of having the tablet of the formula below a tablet used widely.

[0023]

Example 5 of a formula Inside of 100mg FGLM 10mg A lactose 59.4mg Corn starch 20mg Carboxymethyl cellulose Calcium 6mg Hydroxypropylcellulose 4mg Stearin acid Magnesium The tablet of the 0.6mg above-mentioned formula can be used and coated with 2mg of coating agents, such as hydroxypropylcellulose.

[0024] 0.1mg and 5mg of 1mg of 0.5mg of tablets contained 50mg can be obtained for FGLM among 100mg like the example 5 of a formula.

[0025]

Example 6 of a formula Inside of 100mg IGF-I 0.1mg A lactose 69.3mg Corn starch 20mg Carboxymethyl cellulose Calcium 6mg Hydroxypropylcellulose 4mg Stearin acid Magnesium The tablet of the 0.6mg above-mentioned formula can be used and coated with 2mg of coating agents, such as hydroxypropylcellulose.

[0026] 0.001mg, 0.01mg, 0.05mg, 0.5mg, and 10mg of 5mg of 1mg of tablets contained 50mg can be obtained for IGF-I among 100mg like the example 6 of a formula.

[0027]

Example 7 of a formula Inside of 100mg FGLM 10mg IGF-I 0.1mg A lactose 59.3mg Corn starch 20mg Carboxymethyl cellulose Calcium 6mg Hydroxypropylcellulose 4mg Stearin acid Magnesium The tablet of the 0.6mg above-mentioned formula can be used and coated with 2mg of coating agents, such as hydroxypropylcellulose.

[0028] The tablet which blended FGLM, 0.1mg, 0.5mg, 1mg, 5mg, 10mg and IGF-I, 0.001mg, 0.01mg, 0.05mg, 0.1mg, 0.5mg, 1mg, 5mg, and 10mg in the combination of arbitration can be obtained like the example 7 of a formula.

[0029] [Pharmacological test]

1) The operation over epithelium-antierius-corneae expansion (inch vitro) the cornea of a male Japan white rabbit -- using -- Nishida \*\* -- according to the approach (J.Cell Biol., 97, and 1653-1657 (1983)), the epithelium-antierius-corneae expansion length in the tissue culture system of the piece of a cornea was made into the index, and the effect to epithelium-antierius-corneae expansion was considered.

[0030] (The experiment approach) The inside of the culture medium (TC-199) which includes the cornea block (one groups [ six ]) started from the piece of a rabbit cornea for a test compound, and 37 degree C and 5%CO<sub>2</sub> It cultivated under conditions for 24 hours. The cornea block was fixed in ethanol-glacial-acetic-acid (volume ratio 95:5) mixed liquor after culture, embedding was carried out from paraffin, and the intercept was produced. After carrying out deparaffinization of the intercept, the hematoxylin and eosin stain was carried out and the expansion length of an epithelial cell layer was measured under the microscope.

[0031] What was similarly cultivated with the culture medium which does not contain a test compound as control was used.

[0032] (Result) The result when cultivating as an example of an experimental result with the culture medium containing both FGLM independence, IGF-I independence, FGLM, and IGF-I is shown in Table 1. Moreover, the result when making into Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub> (hereafter referred to as GLM), FGLM, Val-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub> (hereafter referred to as VGLM), Ile-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub> (hereafter referred to as IGLM), Tyr-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub> (hereafter referred to as YGLM), and Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub> (hereafter referred to as FFGLM) the peptide added to culture medium with IGF-I is shown in Table 2.

[0033]

[Table 1]

|                                 | 伸展長 (μm) |
|---------------------------------|----------|
| コントロール                          | 433      |
| FGLM (20 μM)                    | 426      |
| IGF-I (10 ng/ml)                | 430      |
| FGLM (20 μM) + IGF-I (10 ng/ml) | 662      |

[0034]

[Table 2]

|                  | 伸展長 (μm) |
|------------------|----------|
| コントロール           | 433      |
| IGF-I (10 ng/ml) | 430      |
| +GLM (20 μM)     | 445      |
| +FGLM (20 μM)    | 662      |
| +VGLM (20 μM)    | 440      |
| +IGLM (20 μM)    | 426      |
| +YGLM (20 μM)    | 433      |
| +FFGLM (20 μM)   | 655      |

[0035] it is shown in Table 1 -- as -- FGLM -- independent or IGF-I -- if independent, the effect to expansion of the epithelium antierius corneae was not accepted, but when cultivated with the culture medium containing both FGLM and IGF-I, remarkable promotion was accepted to expansion of the epithelium antierius corneae.

[0036] Moreover, as shown in Table 2, when FGLM or FFGLM was added, about the peptide added with IGF-I to culture medium, remarkable promotion was accepted to expansion of the epithelium antierius corneae, but when the C terminal tripeptide of substance P and the similar peptide of FGLM were added, the effect to expansion of the epithelium antierius corneae was not accepted.

[0037] 2) Cornea wound healing promotion operation (inch vivo)

a male Japan white rabbit -- using -- Cintron \*\* -- epithelium-antierius-corneae exfoliation was made to cause according to an approach (Ophthalmic Res., 11, and 90-96 (1979)), wound area was measured by having made fluorescein dyeing

area into the index, and the effect to cornea wound healing was considered.

[0038] (The experiment approach) After making epithelium-antierius-corneae exfoliation cause, instillation of the eye lotions containing a test compound was carried out with two time intervals 1 6 times per day (50microl./(time)). When measuring wound area, fluorescein dyeing was performed and the photograph of a cornea was measured. The fluorescein dyeing area of the photoed cornea was computed using the image-analysis processing system.

[0039] The rabbit which applied eyewash in the basis which does not contain a test compound as control was used.

[0040] As an example of an experimental result, 0.05%(w/v) FGLM eye-lotions (eye lotions F-3) independence, (Result) 0.0001%(w/v) IGF-I eye-lotions (eye lotions I-6) independence, The wound area immediately after the epithelium exfoliation when applying eyewash 0.05% (w/v) in both FGLM eye lotions (eye lotions F-3) and 0.0001% (w/v) IGF-I eye lotions (eye lotions I-6) and of 12, 24, and 36 or 48 hours after is shown in Table 3.

[0041]

[Table 3]

|                        | 上皮剥離後の創傷面積 (mm <sup>2</sup> ) |         |         |         |        |
|------------------------|-------------------------------|---------|---------|---------|--------|
|                        | 0 時間                          | 1 2 時間  | 2 4 時間  | 3 6 時間  | 4 8 時間 |
| コントロール                 | 3 5 . 4                       | 3 1 . 6 | 2 0 . 6 | 1 1 . 7 | 3 . 3  |
| F G L M                | 3 5 . 4                       | 3 1 . 0 | 1 9 . 9 | 1 0 . 9 | 2 . 9  |
| I G F - I              | 3 5 . 5                       | 3 0 . 3 | 1 9 . 0 | 1 0 . 0 | 2 . 6  |
| F G L M<br>+ I G F - I | 3 5 . 5                       | 2 8 . 1 | 1 0 . 5 | 2 . 4   | 0 . 1  |

[0042] it is shown in Table 3 -- as -- FGLM -- independent or IGF-I -- if independent, the effect to the wound healing after epithelium-antierius-corneae exfoliation was not accepted, but when eyewash was applied in both FGLM and IGF-I, remarkable promotion was accepted to wound healing.

[0043]

[Effect of the Invention] It was found out that it is useful as a therapy agent of cornea failures, such as a corneal ulcer in the condition that have a wound healing promotion operation of the epithelium antierius corneae, and the cornea received damage from the above-mentioned pharmacological test according to various factors by coexisting with IGF-I whose salts permitted as FGLM which is one of the partial peptides of substance P, or its physic are one of the growth factors, epithelium-antierius-corneae exfoliation, keratitis, or dry eye.

[0044] Moreover, by the tripeptide by the side of the C terminal of substance P, although it coexisted with IGF-I and the epithelium-antierius-corneae expansion promotion operation was able to be accepted in the tetrapeptide and PENTA peptide by the side of the C terminal of substance P, since it did not accept, the smallest unit of the partial peptide of the substance P which coexists with IGF-I required since it has a wound healing promotion operation of the epithelium antierius corneae became clear [ that it is the tetrapeptide by the side of a C terminal ]. Furthermore, the tetrapeptide in which the amino acid of the amino terminal of the tetrapeptide coexists with IGF-I required since an epithelium-antierius-corneae expansion promotion operation was not accepted except Phe, and it has a wound healing promotion operation of the epithelium antierius corneae became clear [ that it must be FGLM which is the tetrapeptide by the side of the C terminal of substance P ].

[Translation done.]

**\* NOTICES \***

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

**TECHNICAL FIELD**

---

[Field of the Invention] This invention relates to the drug-used-in-ophthalmology constituent which makes an active principle the salts permitted as Phe-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub> which is the tetrapeptide by the side of the C terminal of substance P, or (hereafter referred to as FGLM) its physic. Especially, insulin-like growth factor-I (it considers as IGF-I hereafter) which is one of the growth factors is made into another active principle, and it is related with the cornea failure therapy agent which was characterized by blending or using those components together and which has a wound healing promotion operation of the epithelium antierius corneae.

---

[Translation done.]